

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-228096

⑤ Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 昭和62年(1987)10月6日
C 07 H 21/04		7138-4C	
C 12 N 15/00		7115-4B	
C 12 Q 1/68		A-8412-4B	
G 01 N 33/50		P-8305-2G	
/(C 12 Q 1/68		A-	
C 12 R 1:01)			
		審査請求 未請求	発明の数 2 (全 12 頁)

⑭ 発明の名称 カンピロバクター検出用プローブ

⑯ 特 願 昭62-13285

⑰ 出 願 昭62(1987)1月22日

優先権主張 ⑱ 1986年1月22日 ⑲ 米国(US) ⑳ 821393

㉑ 発 明 者 アヨウブ・ラシユトチ アメリカ合衆国マサチューセッツ州01532, ノースボロ,  
ヤン デーヴィス・ストリート 240

㉒ 出 願 人 インテグレイテッド・アメリカ合衆国マサチューセッツ州フレイミングム, ニュ  
ジェネティックス・イー・ヨーク・アベニュー 51  
ンコーポレーテッド

㉓ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外5名

明 細 書

1. [ 発 明 の 名 称 ]

カンピロバクター検出用プローブ

2. [ 特 許 請 求 の 範 囲 ]

(1) カンピロバクター(Campylobacter)属のrRNAとハイブリッドを形成することが可能であるが、いかなる非カンピロバクター細菌のrRNAともハイブリッドを形成し得ないDNA配列から実質的に構成されるDNAプローブ。

(2) 上記rRNAが上記カンピロバクター属のリボソームの5S、16S、あるいは23Sサブユニットのうち一つから成る、特許請求の範囲第1項記載のDNAプローブ。

(3) 該プローブが次の配列の15塩基対以上の配列に実質的に相補的である、特許請求の範囲第1項記載のDNAプローブ:

AAGCUUGCUA GCUUGCUAGA AGUGGAUUAG  
UGGCGCACGG GUGAGUAAAGG UAUAGUUAAU  
CUGCCCUAGA CAAGAGGACA ACAGUUGGAA  
ACGACUGCUA AUACUCUUA CUCUGCUUA

(1)

ACACAAGUUG ACUAGGGAAA GUUUUUCGGU  
GUAGGAUGAG ACUAAUAGU AUCAGCUAGU  
UGGUAAGGUA AUGGCUUACC AAGGCUAUGA  
GGCUUAAACUG GUCUGAGAGG AUGAUCAGUC  
ACACUGGAAC UGAGACACGG UCCAGACUCU  
ACGGGAGGCA GCAGUAGGGA AUUUUGCGCA  
AUGGGGGAAA CCCUGACGCA GCAACGCCGC  
GUGGAGGAUG ACACUUUUCG GAGCGUAAAC  
UCCUUUUCUU AGGGAAGAAU UCUGACGGUA  
GCUAAGGAAU AAGCACCGGC UAAUCUCGUG  
CCAGCAGCCG CGGUAAUACG GAGGGUGCAA  
GCGUACUCG GAAUCACUGG GCGUAAAGGG  
CGCGUAGGCG GAUUUACAAG UCUCAAGUGA  
AAUCUAAUGG CUUAGCCAUU AAAUCGCUUG  
GGAAACUGAU AGUCUAGAGU GCAGGGAGAG  
GCAGAUGGAU UGGUGGUGUA GGGUAAAUCC  
UAGAUUUCAC AGAUACAUUG CGAGGCGAUC  
UCUGGAUCCA UCGAGCCUA または  
ACCAAGAAUA CCCAUUGCGA AGGCGAUCUG  
CUGGAACUCA ACUGACGCUA AGGCGCGAAA

(2)

特開昭62-228096(2)

GCGUCCCCAG CAAACAGGAU UAAGAUACCC  
 UUGUAGUCCA CGCCCUAAAA CGACGUACAC  
 UAGUUAUUCC CCUGCUAGUC AUCUCUGUUAU  
 UGUUGCUAAC GCAUUAAGUG UACCGCCUAG  
 GGUUACGGU CGCAAGAUUA AUUUCGCAA  
 CGAGCGCACC CACGUUUUG UUGCUAACGG  
 UUCGGACCGA GACACUCUAA AUAGGCGUCC  
 UUCGUAAAGGA GGAGGAAGGU GUGGACGACG  
 UCAAGUCAUC AUGGCCCUUA UGCCCCAGGC  
 GACACACGUG CUACA AUGGC AUUAACA AUG  
 AGACGCAUA CCGCGAGGUU GGGCAAUUA  
 UAAAUUAGUC CGGUUCGGAU UGUUCUCUGC  
 AACUCGAGAG CAUGAAGCCG GAAUCGCUAG  
 UAAUCGUGGA UCAGCCAUGC UACGGUGAAU  
 ACGUUCGCCG GUCUUGGAAG UCAAGCGCCG  
 UCACACCAUG GGAGUUGAUU UCACUCGAAG  
 CCGGAUAUCU AAACUAGUUA CCGUCCACAG  
 UGGAUACACC GCGCGUGGGG UGAAGUCGUA  
 ACAAGGUUAC CGUAGGAGAA CCUGCGGUGC  
 GAUCACCUCC U。

(3)

ッド複合体を形成する条件下で、上記DNAプローブを該試料中の細菌と接触させ、

該ハイブリッド複合体を該試料内のカンピロバクターの指標として検出することから成る、

該試料中のカンピロバクターの存在を検出する方法。

(7) 上記プローブが、カンピロバクターリボソームRNAの5S、16S、あるいは23S由来である、特許請求の範囲第6項記載の方法。

(8) 上記プローブが、以下の配列の15塩基対以上の配列と実質的に相補的である特許請求の範囲第6項記載の方法：

AAGCUUGCUA GCUUGCUAGA AGUGGAUUAG  
 UGGCGCACGG GUGAGUAAGG UAUAGUUAAU  
 CUGCCCUACA CAAGAGGACA ACAGUUGGAA  
 ACGACUGCUA AUACUCUUAU CUCCUGCUUA  
 ACACAAGUUG ACUAGGGAAG GUUUUUCGGU  
 GUAGGAUGAG ACUUAUAGU AUCAGCUAGU  
 UGGUAAGGUA AUGGCUUACC AAGGCUAUGA  
 CGCUUAACUG GUCUGAGAGG AUGAUCAGUC

(5)

(4) 上記カンピロバクター属が次の種：

C.ジエジュニ(C. jejuni)、C.フエタス・サブ  
 スプ.ジエジュニ(C. fetus subsp. jejuni)、  
 C.コリ(C. coli)、ビブリオ・コリ(Vibrio  
 coli)、C.フエタス(C. fetus)、C.フエタス・  
 サブスプ.フエタス(C. fetus subsp. fetus)、  
 C.フエタス・サブスプ.インテステイナリス(C.  
 fetus subsp. intestinalis)、C.フェカリス  
 (C. fecalis)、あるいはC.ヒオインテステイナ  
 リス(C. hyointestinalis)のいずれかである。  
 特許請求の範囲第1項記載のDNAプローブ。

(5) 該プローブが標識されている、特許請求の  
 範囲第1項記載のDNAプローブ。

(6) カンピロバクター属のrRNAと選択的にハイ  
 ブリッドの形成を行なうが、カンピロバクター  
 属に属さない種のrRNAとはハイブリッドの形成  
 をしないような少なくとも1つのDNAプローブ  
 を用意し、

上記プローブが試料中の該カンピロバクター属  
 のrRNAとハイブリッドを形成して核酸ハイブリ

(4)

ACACUGGAAC UGAGACACGG UCCGACUCUU  
 ACGGGAGGCA GCAGUAGGGA AUUUUGCGCA  
 AUGGGGGAAA CCGUGAAGCA GCAACGCCGC  
 GUGGAGGAUG ACACUUUUCG GAGCGUAAAC  
 UCCUUUUCUU AGGGAAGAAU UCUGACGGUA  
 CCUAAGGAU AAGCACCGGC UAACUCOGUG  
 CCAGCAGCCG CGGUAAUACG GAGGGUGCAA  
 GCGUUAUCUG GAAUCACUGG GCGUAAAGGG  
 CGCGUAGGCG GAUUAUCAAG UCUCAAGUGA  
 AAUCUUAUGG CUUAGCCAUU AAACUGCUUG  
 GGAAACUGAU AGUCUAGAGU GCAGGGAGAG  
 GCAGAUGGAU UGGUGGUGUA GGGUAAAUCC  
 UAGAUUAUCAC AGAUACAUUG CGAGGCGAUC  
 UCUGGAUCCA UCGAGCCUA または  
 ACCAAGAAUA CCCAUUGCGA AGGCGAUCUG  
 CUGGAACUCA ACUGACGCUA AGGCGCGAAA  
 GCGUCCCCAG CAAACAGGAU UAAGAUACCC  
 UUGUAGUCCA CGCCCUAAAA CGACGUACAC  
 UAGUUAUUCC CCUGCUAGUC AUCUCUGUUA  
 UGUUGCUAAC GCAUUAAGUG UACCGCCUAG

(6)

特開昭62-228096 (3)

GGUGUACGGU CGCAAGAUUA AUUUCGCAA  
CGAGCGCACC CACGUUUUUG UUGCUAACGG  
UUGGGACCGA GACACUCUAA AUAGGCUGCC  
UUGCUAAGGA GGAGGAAGGU GUGGACGACG  
UCAAGUCAUC AUGGCCCUUA UGCCCCAAGGC  
GACACACGUG CUACAAUGGC AUUAACAAUG  
AGAAGCAUA CCGCGAGGUU GGGCAAUCUA  
UAAAUUGUC CGGUUCGGAU UGUUCUCUGC  
AACUCGAGAG CAUGAAGCGG GAAUCGCUAG  
UAAUCGUGGA UCAGCCAUGC UACGGUGAAU  
ACGUUCCCGG GUCUUGGAAC UCACCGCCCG  
UCACACCAUG GGAGUUGAUU UCACUCGAAG  
CCGGAUAUCU AAACUAGUUA CCGUCCACAG  
UGGAUUCACC GCGCGUGGGG UGAAGUCGUA  
ACAAGGUAAC CGUAGGAGAA CCUGCGGUCG  
GAUCAGCUCC U。

(9) 上記カンピロバクター属が、C.ジエジュニ (C. jejuni)、C.フエタス・サブスプ. ジエジュニ (C. fetus subsp. jejuni)、C.コリ (C. coli)、ビブリオ・コリ (Vibrio coli)、C.

(7)

およびC.コリ (C. coli) は、ヒトの下痢 (ブレイザー (Blaser) 他、1979, Ann. Intern. Med. 91:179) および肺炎 (G.K.モリス (Morris) 他、1985, Manual of Medical Microbiology, レンネット (Lennette) 他編、アメリカン・ソサイアティー・フォー・マイクrobiology, ワシントン, D.C.) の原因となる、二つの最も重要な種である。他のカンピロバクター属な、ヒトあるいは動物の流産、敗血症、および増強性回腸炎などの疾患の原因となることと関連づけられてきた。さらに、カンピロバクターに類似した微生物が、同性愛者の排泄物 (フェネル (Fennell) 他、1984, J. Infect. Dis. 149:58) および胃液寄生菌 (カスパー (Kasper) 他、1984 Infection. 12:179) から単離された。

(従来技術)

臨床標本 (例えば、便など) 中のカンピロバクターの存在は、上記生物の増殖に適した条件下の、微生物学的培地で、適切に調整した試料を培養することにより検出される。得られたコロニーは、

(9)

フエタス (C. fetus)、C.フエタス・サブスプ. フエタス (C. fetus subsp. fetus)、C.フエタス・サブスプ. インテステイナリス (C. fetus subsp. intestinalis)、C.フェカリス (C. fecalis)、あるいはC.ヒオインテステイナリス (C. hyointestinalis) のいずれかである。特許請求の範囲第6項記載の方法。

10 上記試料が胃腸からの試料である。特許請求の範囲第6項記載の方法。

11 上記試料が排泄物試料である。特許請求の範囲第6項記載の方法。

12 上記試料が食物試料である。特許請求の範囲第6項記載の方法。

## 3. [発明の詳細な説明]

(産業上の利用分野)

本発明は、カンピロバクター (Campylobacter) 属に属する細菌の検出に関するものである。

カンピロバクター (Campylobacter) 属の各種の細菌の検出は、多様な医学的情況において重要である。カンピロバクター・ジエジュニ (C. jejuni)

(8)

典型的には試料の採取後48時間に開始し、終了するのに数日要する過程により、形態学および生化学的特徴を検査する。

核酸ハイブリッド形成 (ニガード (Nygaard) 他、1964, J. Mol. Biol., 9:125) は、多様な組み合わせ (DNA/DNA, DNA/RNA, RNA/RNA) で行なわれ、溶液中あるいは固相支持体上で行なわれ得る。ハイブリッド形成アッセイのための固相支持体は慣習的にニトロセルロース (ギレスピー (Gilespe) およびスピゲルマン (Spiegelman)、1965, J. Mol. Biol. 12:829)、あるいは、化学的反応基を有する紙 (アルウィン (Alwine) 他、1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:4350) を用いる。核酸ハイブリッド形成のより迅速で信頼性のある形式の進歩により、細菌性およびウイルス性病原体の同定および検出に於いて、強力な本技術の使用が可能になつた。例えば、テイバー (Taber) 他 (1983年9月2日に出版された米国特許出願第529,031号明細書; 本出願人に譲渡されている)

(10)

特開昭62-228096(4)

は、食物中のサルモネラ (Salmonella) 種の細菌の存在の決定にDNAプローブを用いることを示している；ファルコウ (Falkow) (米国特許第4,358,535号) は、臨床用検体中のエンテロトキシン性大腸菌 (enterotoxigenic E. coli) の検出にDNAプローブを用いることを示している。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明は、便、血液、あるいは他の体液あるいは組織のような生物学的試料内のカンピロバクター属の細菌の存在を検出するアッセイに於けるDNAプローブの使用に関するものである。上記プローブは、食物および動物由来の生物学的試料あるいは物質中のカンピロバクター属の存在の検出にも使用し得る。上記アッセイは、カンピロバクター細胞内の極度に重複したリボソームRNA (rRNA) に対する上記プローブの相補的性質に基づくものである。

本発明の使用による臨床用検体中のカンピロバクターの検出には、カンピロバクター属のrRNAに相補的な1種類以上のDNAプローブを使用す

(11)

的に相補的な(すなわち、通常のハイブリッド形成条件下でハイブリッド形成を行なう)ものである：

```

AAGCUUGCUA GCUUGCUAGA AGUGGAUUAG
UGGCGCACGG GUGAGUAAAGG UAUAGUUAAU
CUGCCCUACA CAAGAGGACA ACAGUUGGAA
ACGACUGCUA AUACUCUAAU CUGCUGCUUA
ACACAAGUUG ACUAGGGAAA GUUUUUCGGU
GUAGGAUGAG ACUUAUAGU AUCAGCUAGU
UGGUAAGGUA AUGGCUUACC AAGGCUAUGA
CGCUUACUG GUCUGAGAGG AUGAUCAGUC
ACACUGGAAC UGAGACACGG UCCAGACUCU
ACGGGAGGCA GCAGUAGGGA AUAUUGCGCA
AUGGGGAAA CCGUGACGCA GCAACGCGC
GUGGAGGAUG ACACUUUUCG GAGCGUAAAC
UCCUUUUUUU AGGGAAGAAU UCUGACGGUA
CCUAAGGAAU AAGCACCGGC UAAUCUGUG
CGAGCAGCG CGGUAAUACG GAGGGUGCAA
GCGUACUCG GAAUCACUGG GCGUAAAGGG
CGCGUAGGCG GAUUUAUCAAG UCUCGAAGUGA

```

(13)

る。上記DNAプローブは、カンピロバクターに特異的であり、他のいかなる細菌のrRNAともハイブリッド形成しない。上記DNAプローブの各々は、カンピロバクターからクローン化したDNAフラグメントであるか；あるいは、カンピロバクター中のrRNAをコードする遺伝子のヌクレオチド配列の決定後合成したものである。上記プローブの各々は、カンピロバクター属の既知の種のはほとんどとハイブリッド形成を行なう。

(問題点を解決するための具体的手段)

本発明はカンピロバクター属のrRNAとハイブリッド形成が可能であるが、非カンピロバクター属のrRNAとはハイブリッド形成を行わないDNA配列から実質的に構成されるDNAプローブに関するものである。一般的には、本発明のDNAプローブは、カンピロバクターのリボソームの5S、16Sあるいは23SrRNAのRNAと実質的に相補的であり、好ましい態様に於ては、以下のRNA配列(C.ジェジュニ(C. jejuni)の16SrRNA)の15塩基対以上の配列と実質

(12)

```

AAUCUAAUGG CUUAGCCAUU AAACUGCUUG
GGAAACUGAU AGUCUAGAGU GCAGGGAGAG
GCAGAUUGGAU UGGUGGUGUA GCGUAAAUCC
UAGAUUAUCAC AGAUACAUGG CGAGGCGAUC
UCUGGAUCCA UCGAGCCUA

```

あるいは、以下の配列

```

ACCAAGAAUA CCCAUUGCGA AGGCGAUCUG
CUGGAACUCA ACUGACGCUA AGGCGCGAAA
GCGUCCCCAG CAAACAGGAU UAAGAUACCC
UUGUAGUCCA CGCCCUAAAA CGACGUACAC
UAGUUUUUCC CGUGCUAGUC AUCUCUGUUA
UGUGGCUAAC GCAUUAAGUG UACCGCGUAG
GGUGUACGGU CGCAAGAUUA AUUUCGCGAA
CGAGCGCACG CACGUUUUUG UUGCUAACGG
UUCGGACCGA GACACUCUAA AUAGGCGUGG
UUCGUAAAGG GAGGAAGGU GUGGACGACG
UCAAGUCAUC AUGGCCCUUA UGCCCCAAGGC
GACACACGUG CUACAAUGGC AUUAUACAAUG
AGACGCAUA CCGCGAGGUU GGGCAAUUA
UAAAUUUGUC CGGUUCGGAU UGUUCUCUGC

```

(14)

特開昭62-228096(5)

AACUCGAGAG CAUGAAGCCG GAAUCGCUAG  
 UAAUCGUGGA UCAGCCAUGC UACGGUGAAU  
 ACGUUCGGG GUCUUGGAAC UCACCGCCCG  
 UCACACCAUG GGAGUUGAUU UCACUCGAAG  
 CCGGAAUACU AAACUAGUUA CCGUCCACAG  
 UGGAAUCAAC GCGCGUGGGG UGAAGUCGUA  
 ACAAGGUAA CUGAGGAGAA CCUGCGGUCG  
 GAUCACCUCC U。

好ましい懸標に於いては、DNAプローブは、例えば<sup>32</sup>Pなどを用いて放射性標識を行なうか、あるいは、検出可能な化合物あるいは検出可能な複合体を形成する指示物質に選択的に結合することのできる化合物を用いて非放射性標識を施す。上記複合体には、アビジンとビオチン、抗原と抗体、および酵素とそれに対応する基質のような化合物を含む。別の非同位体標識として、蛍光化合物、電子密度の高い化合物、アクリジンエステル類および発光ランタニド類を含む。

本発明のプローブは、該プローブが試料中に存在するあらゆるカンピロバクター種のrRNAとハ

(15)

イブリッド形成可能となる条件下で、該プローブを試料中の細菌と接触させることにより、試料中のカンピロバクターの存在を検出するために使用され、従つて核酸ハイブリッド複合体を形成する。上記複合体は検出され、試料中のカンピロバクターの存在の証拠となる。

以下に述べるDNAプローブを用いたカンピロバクターの検出は、迅速かつ正確な結果を与え、臨床検査室から短時間のうちに標本中のカンピロバクターの有無を医師に報告することを可能にする。さらに、本試験は他の様々な変種が多い生物学的性質でなく細菌の核酸含量に依存する。これにより、カンピロバクターの生物学的に典型的な種のみならず、非典型的な種も検出可能となる。さらに、本アッセイ法は検出に必ずしも生存している細菌を必要としないため、検査室への標本の輸送のための輸送培地の使用の必要性が除かれる。

本発明の他の特徴および利点は、以下の実施例および前述の特許請求の範囲から明確になるであろう。

(16)

## 実施例

### (構造)

#### リボソームRNA(rRNA)

リボソームはタンパク質とRNAの複合混合物から成り、全ての生物に於いて遺伝情報の翻訳に関与する。細菌には3種の異なるリボソームRNA分子が存在する(5S, 16S, 23S)。ほとんどの細菌はrRNA遺伝子の多重コピーを有し(ノラー(Noller), 1984, Ann. Rev. Biochem. 53:119)、各細菌細胞は約 $1.2 \times 10^4$ 個のリボソームを含み、従つて少なくとも $1.2 \times 10^4$ 分子の各rRNAを含む。細菌中の他の遺伝子は1細胞あたり1~2コピー存在し、そのmRNA産物は安定ではなく、常に転写されているわけではない。従つて、ハイブリッド形成によるrRNAの検出は、他の遺伝子のDNAに対するハイブリッド形成に対して約 $10^4$ 倍感度が良いことになる。

#### プローブ

プローブは、カンピロバクター細胞のゲノム

(17)

DNAあるいはリボソームRNA由来であるか、あるいはin vitroで合成する。上記プローブは、実質的にカンピロバクター内のrRNA配列に相補的なDNA配列である。検出アッセイに有効に使用するためには、プローブの長さが15塩基以上であることのみが必要である。上記プローブを、一般的にそれらの検出を可能にする方法のいずれか、により標識する；例えば、1985年8月19日に提出され、同じ譲受人に譲渡され、これにより参考として組み入れられる、モック(Mock)らによるUS 4,660,388に述べられているように同位体的あるいは非同位体的に標識する。

#### カンピロバクター(Campylobacter)の細菌種

カンピロバクター(Campylobacter)属については、R.M. シュミバート(Smibert)により、バージェイズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)(第9版, 1984, 第1巻, ウィリアムス・アンド・ウィルキンス社)に述べられている。

(18)

特開昭62-228096 (6)

以下に述べるスクリーニング法に使用可能なカンピロバクター (Campylobacter) 種特に C. ジェジュニ (C. jejuni) および C. コリ (C. coli) は、多くの供給源、特に、主要医療センターから入手可能である。例えば、良く解析された C. ジェジュニ (C. jejuni) および C. コリ (C. coli) 種は、マサチューセッツ州ウオーセスターのマサチューセッツ・メデイカル・センター大学のゲイリー・ドーン (Gary Doern) 気付で入手可能である。C. ジェジュニ (C. jejuni) および C. コリ (C. coli) 種は、また、ロード・アイランド州フイスクヴィルのスコット・ラボラトリーズ社 (Scott Laboratories, Inc.) から入手可能である。臨床的単離物の他の供給源には、コロラド州デンバーのペテランズ・アドミニストレーション・メデイカル・センター、ミズーリ州ロックビルのパーマント・デパートメント・オブ・パブリック・ヘルス、およびアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) を含む。

(19)

セラチア・リクエファシエンシス (Serratia liquefaciens), セラチア・マルセシエンシス (Serratia marcescens), シゲラ・フレクスネリ (Shigella flexneri), シゲラ・ソネイ (Shigella sonnei), シゲラ・ビオイダイ (Shigella boydii), シゲラ・ダイセンテリヤ (Shigella dysenteriae), ビブリオ・パラヘモリテिकास (Vibrio parahaemolyticus), およびイエールシニア・エンテロリテイカ (Yersinia enterocolitica)。

#### 万 法

##### グループの単離

C. ジェジュニ (C. jejuni) DNA のゲノムライブラリは、適当なプラスミドあるいはファージベクター内に作製する。多数の適当なベクターは、入手可能であり、マニアティス (Maniatis) 他、(1982) Molecular Cloning, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリーに述べられている。そのようなベクターの一つは、pUN121 (ニルソン (Nilsson) 他、1983, Nucleii

(21)

##### 非カンピロバクター種

一般的に、以下に示すのはカンピロバクターの存在を試験する試料内に通常存在する種である：大腸菌 (Escherichia coli), エンテロバクター・クロアカエ (Enterobacter cloacae), エンテロバクター・アグロミイ (Enterobacter agglomerans), エンテロバクター・ゲルゴビエ (Enterobacter gergoviae), シトロバクター・フェルンデイ (Citrobacter freundii), シトロバクター・ジベルサス・レヴィヘ (Citrobacter diversus-levihea), クレブシエラ・ニューモニア (Klebsiella pneumoniae), クレブシエラ・オキシトカ (Klebsiella oxytoca), プロテウス・ミラビリス (Proteus mirabilis), プロテウス・モルガニ (Proteus morganii), プロテウス・レツテグ (Proteus rettgeri), サルモネラ・エンテリタイデイス (Salmonella enteritidis), サルモネラ・セロタイプ C1 (Salmonella serotype C1), サルモネラ・ティフムリウム (Salmonella typhimurium),

(20)

Acids Research, 11:8019) である。コーエン (Cohen) 他 (1973, Proc. Natl Acad. Sci. 70:3240) に述べられた一般的手法を用いて、C. ジェジュニ (C. jejuni) N941 (ATCC 39983) 由来の DNA を、例えば Hind III のような制限エンドヌクレアーゼで切断し、適当なベクターの適当な部位に連結する。上記連結複合体を、次に、HB101 株のような大腸菌コンピテント細胞 (competent E. coli cells) の形質転換に使用する。形質転換体は、適当なマーカーを基にして選択する。形質転換体のコロニーはニトロセルロース膜に移し、膜上で細胞溶解後、フィルターをカンピロバクター由来の <sup>32</sup>P で末端を標識したリボソーム RNA (rRNA) (慣習的方法によつて調製) を用いたハイブリッド形成実験によりスクリーニングする。上記ハイブリッド形成実験の結果から、rRNA をコードする C. ジェジュニ (C. jejuni) 由来 DNA 配列を有するプラスミドを含むコロニーを同定することができる。そのようなプラスミド、例えば pAR140 (後記参照)

(22)

特開昭62-228096(7)

は次に、標準的な制限エンドヌクレアーゼ分析およびハイブリッド形成(マニアティス(Maniatis)他、前出)を用いて解析する。ハイブリッド形成により各々のrRNA(すなわち、16S、23Sおよび5S)をコードするDNAフラグメントを同定した後、それらのDNAのヌクレオチド配列(後記参照)を標準的方法(マクサム(Maxam)他、1980, Methods. Enz. 65:499; サンガー(Sanger)他、1977, Proc. Nat. Acad. Sci. 74:5453)により決定する。このヌクレオチド配列を、次に、公表されている他の種々のrRNA配列と比較し、相同性領域および非相同性領域を決定する。公表されている他の配列と相同性のない領域を、サブクローン化するか、あるいは、オリゴヌクレオチド自動合成装置を用いて合成する。これらの特徴的なカンピロバクターDNAフラグメントを<sup>32</sup>Pで標識し、カンピロバクターおよび非カンピロバクターの双方に対して試験するためのプローブとして使用する。必要なら、プローブ配列をベクターに組み込み、得られたベク

(23)

タープログラム、マイクロジェニー(Microgenie)TMを用いて、サイソフト(SciSoft)社の全核酸データベースと比較した。第1図の第1の配列中のヌクレオチド53から153までの配列とデータベースに存在する配列との間には、配列の相同性は見いだせなかつた。2種の合成オリゴヌクレオチドを上記配列から作製し、合成し、ハイブリッド形成アッセイにより、多種のカンピロバクターおよび非カンピロバクターの菌株に対して試験した。例として、第2図に2種の合成オリゴヌクレオチドAR196およびAR197のヌクレオチド配列を示す。これらのプローブは、カンピロバクターに特異的であることが示され、非カンピロバクター細菌由来のDNAあるいはRNAとはハイブリッド形成を行なわなかつた。同様に、3種の合成オリゴヌクレオチドを第1図の第2の部分の配列から合成し、それらをAR327-329として第2図に示す。これらもカンピロバクターのrRNAに特異的であることが示された。

第1図および第2図に示した配列に加え、プロ

(25)

ターをプローブとして用いることもできる;これに使用するベクターは、試験される試料中に存在する可能性のあるカンピロバクターあるいは非カンピロバクターのいずれにも相同性を有してはならない。カンピロバクター属の菌株に特異的なプローブ配列を以下に示す。

第1図はクローンpAR140中のDNA配列から推定した16S rRNAの2部分のヌクレオチド配列を示している。この配列を大腸菌由来rRNA遺伝子のヌクレオチド配列(ブロックス(Brosius)他、1981, J. Mol. Biol. 148:107)と比較すると、上記二遺伝子間に注目すべき相同性が示される。しかしながら、二つの遺伝子分子は数箇の領域で確実に異なり、そのような領域には、第1図に示される第1の配列のヌクレオチド53と153との間の配列も含まれる。大腸菌と相同性を待たないこれらの領域を、有意な相同性を探索するために、公表されている他の細菌および真核生物のrRNA配列(ネルス(Nelles)ら、1984, Nucl. Acid Res., 12:8749)およびコンピュ

(24)

ーブとして有効だと考えられる他の領域が存在する。上記の例に於いては16S rRNAの配列のみ問題にしているが、同様の分析を23S rRNAおよび5S rRNAに対しても使用可能である。異なる計画(後記参照)により、我々はカンピロバクターに特異的だと考えられる、23S rRNAをコードする遺伝子領域を同定した。その領域は、23S rRNAをコードするDNAフラグメントの制限酵素分解および大腸菌(E. coli)およびカンピロバクター(Campylobacter)由来の末端標識したrRNAに対してサザン・ブロット・ハイブリッド形成によつて同定した。この方法により、23S rRNA遺伝子中の600bpフラグメントが大腸菌(E. coli)のrRNAと非相同的であることが見いだされた。このフラグメントを他の細菌由来のrRNAと同様な分析を行なうことにより、該DNAフラグメントのプローブとして識別性を確認することができる。

#### プローブ単離の異なる方法

上述の方法に加え、他の生物のrRNAとは相同

(26)

特開昭62-228096(8)

性を持たないカンピロバクターの rRNA と相補的な DNA 配列を単離し同定することを可能にする。さらに別の方法が存在する。そのような方法のひとつは、逆転写酵素の使用である。逆転写酵素は、RNA を鋳型として用い、該鋳型 RNA と相補的な DNA 鎖 (cDNA) を転写する。この酵素を用いることにより、カンピロバクターの rRNA から cDNA を合成することができる。カンピロバクター特異的 cDNA の単離は、以下に述べる二つの方法のうちの一つで行なわれる：

(a) cDNA を溶液中で他の細菌性あるいは真核生物の rRNA とハイブリッド形成させる。非カンピロバクター生物に相同性を有する cDNA は二本鎖 DNA/RNA 複合体を形成するであろう。生じた複合体は、次に、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーによつて cDNA のハイブリッド形成していないフラクションから分離する。ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー法は、ベルナルディ (Bernardi) (1969, Biochem. Biophys. Acta 174:423) に示されている。単鎖として

(27)

スクレオチドプローブの特異性を、ハイブリッド形成実験により決定した。その結果、これらのオリゴスクレオチドは表 1 に挙げたカンピロバクター属の菌種と特異的にハイブリッドを形成するが、非カンピロバクターとはハイブリッドを形成しない。

表 1: DNA プローブで試験したカンピロバ

種	試験した 種の数	由 来
C.ジエジュニ (C. jejuni)	99	a
C.コリ (C. coli)	15	a
C.フエタス (C. fetus)	8	a
C.ラリデイス (C. lariidis) 35221	1	ATCC <sup>b</sup>
C.フエタス・サブスプ.ベネリアリス (C. fetus subsp. venereal) 19438	1	ATCC <sup>b</sup>
C.ヒョイントスティナリス (C. hyointestinalis) 35217	1	ATCC <sup>b</sup>

a. これらの種は、マサチューセッツ医療センター大学ゲイリー・ドルン (Gary Doern), コロラド州デンバー, V A

(29)

残存している cDNA はカンピロバクター特異性プローブとして使用可能でありあるいはサブクローン化して単離することができる。本方法は、多種の源由来の異なる rRNA で数回繰り返すことができる。

(b) カンピロバクター rRNA から得た cDNA を、ビオチンで標識した他の細菌由来の全ゲノム DNA あるいはクローン化した rRNA 遺伝子とハイブリッド形成される。ハイブリッド形成後、上記 DNA をアビジンの結合した 1 本以上のカラムに通過させる；このカラムは全てのビオチン化された DNA、従つて、ビオチン化された DNA とハイブリッド形成するあらゆる DNA を吸着する。ハイブリッド形成しない、換言すれば他の細菌 DNA に対して相同性がほとんどあるいは全くない DNA は、カラムに保持されず、従つて、回収され、プローブとして用いられるか、あるいは、サブクローン化され、単離される。

#### 排泄物標本の試験

第 2 区のカンピロバクターのための合成オリゴ

(28)

医療センターの M. J. ブレイザー (M. J. Blaser), およびバーモント州バーリ

ントン、バーモント保健局のタニヤ・サンデロス (Tanya Sanders) から得た。

b. ミズーリ州ロックスビル、アメリカン・タ イプ・カルチャー・コレクション

排泄物試料中に通常存在する細菌に対してハイブリッド形成を行なわないことは以下のことを示した：10 人の異なる健康なヒト由来の排泄物標本を各々の DNA プローブでスクリーニングした。上記実験のために、直接試験と同様に、数種の異なる富集化法を用いた。排泄物直接試験は、標本をニトロセルロース膜フィルター上に標本をスポットし、細胞溶解後、放出された DNA のフィルターへの固定を行なつた後、それらの標本を <sup>32</sup>P で標識した DNA プローブとハイブリッド形成させることにより行なつた。富集化法は次のように行なう：(a) 排泄物標本を血液寒天プレート上に注入し、好氣的、微好氣的、および嫌氣的条件下で

(30)



インキュベーションする；あるいは(b)カンピー  
B A P ( Campy-BAP ) プレートに注入して、微  
好気的あるいは好気的条件下でインキュベーション  
する；あるいは排泄物標本をL-プロスに注入し、  
37℃で振とうしながらインキュベーションする。  
富裕化後、得られた細菌を直接試験用排泄物と同  
様に試験した。この試験の標本では、カンピー  
ロバクター特異的DNAプローブとのハイブリッ  
ド形成は見い出されなかった。上記標本を人為的  
にカンピーロバクターとともに注入した場合のみ、  
DNAプローブに対するハイブリッド形成が見い  
だされた。

#### プローブの使用

rRNAと相補的なDNAプローブによつてカン  
ピーロバクターの検出を行なうために、数種の方法  
および形式を用いることができる。DNAハイブ  
リッド形成のパラメーターおよび動力等は本分野  
では広く知られており(D.E.ケンネル(D.E.  
Kennel), 1971, Progress in Nucleic Acid,  
Research and Molecular Biology, 11巻, アカ

(31)

リッド形成で形成された二本鎖ハイブリッドは、  
ヒドロキシapatiteクロマトグラフィー(ベル  
ナルディ(Bernardi), 1971, Methods in  
Enzymology, 21D:95)あるいは、ブレナー  
(Brenner)他(1969, Anal. Biochem. 28:  
447)に述べられている逆心法によつても検出  
可能である。

別のアッセイ法では、溶液中の相補的DNAプ  
ローブに対して試料由来のrRNAをハイブリッド  
形成させ、DNA/RNAハイブリッドに特異的  
な抗体を用いてDNA/RNAハイブリッドを検  
出する。そのような抗体は、報告されている(ア  
ルカバー(Alcover)他、1982 Chromosoma  
(Berl.)87:263)。そのような抗体は様々な  
方法で使用し得る；例えば、抗体を固相(チュー  
ブ、ビーズ等)に結合させることができ、あるい  
は、DNA/RNA特異的抗体を蛍光化し、固相  
と結合させた、蛍光に特異的な二次抗体によつて  
検出する；あるいは、DNA/RNA抗体を溶液  
中で使用し、固相上に固定したタンパク質Aを添

(33)

デミット・プレス、および、マインコス(Mein-  
koth)他、1984, Anal. Biochem. 138:267)。  
本分野に熟達した者は、温度やイオン強度のよう  
なハイブリッド形成条件を調節することにより選  
択性および感度の水準を変えることが可能なこと  
は認識されるであろう。

ハイブリッド形成は通常溶液内あるいは固体支  
持体上で行なわれる。

#### (a) 溶液中でのハイブリッド形成

標本とプローブDNAを溶液中で混合し、ハイ  
ブリッドを形成させる。ハイブリッドの形成後、  
種々の方法によつて、単鎖および二本鎖の核酸を  
分離し、定量することが可能である。例えば：ニ  
ガード(Nygaard)他(1964, J. Mol. Biol.  
9:125)はニトロセルロース膜を通して濾過す  
ることにより、ハイブリッド形成後のDNA/RNA  
ハイブリッドの定量法を述べている。他の方法で  
は、単鎖核酸をヌクレアーゼS1で加水分解し、  
続いて加水分解されていない核酸を酸(例えば、  
トリクロロ酢酸)で沈殿させる。溶液中のハイブ

(32)

加して使用することも可能である(オキーフ  
(O'Keefe)他、1980, J. Biol. Chem. 255:  
561)。抗体を使用して行なえる他の方法は当業  
者に知られている(バン・ブナリス(Van Vun-  
lis)他、1985, Methods of Enzymology, 70  
巻, Kieck, リガンド-バインダーアッセイ, 標  
識, および分析法, マーセル・デッカー社, ニュ  
ーヨーク)。

#### (b) 固相上でのハイブリッド形成

ハイブリッド形成に関与する核酸のうち一方を  
固体支持体上に固定しておく。通常、試験試料由  
来の核酸が固定される種であり、単鎖である。多  
種の固相支持体が入手可能であり、ニトロセルロ  
ース、ナイロンあるいは誘導化された紙を含む。  
固相ハイブリッド形成の例は、テイバー(Taber)  
およびフィッツ(Fitts)(米国特許出願第  
529,031号, 1983年9月2日出願)およびラ  
シュティアン(Rashtchian)他(米国特許出願第  
692,778号, 1985年1月17日出願)に示さ  
れており、双方とも本出願人に譲渡されている。

(34)

特開昭62-228096(10)

RNAを固体支持体上に固定し得る多くの方法は、この分野で知られている(マニアティス(Maniatis)前出;アルウィン(Alwin)他、1977, Proc. Nat. Acad. Sci., 74:4350;およびトーマス(Thomas), 1980, Proc. Nat. Acad. Sci., 77:5201)。

伝統的な固相ハイブリッド形成の応用としては、サンドイッチハイブリッド形成(ランキ(Ranki)他、1983, Gene 21:77)が知られている。初期のサンドイッチハイブリッド形成では、固体支持体としてニトロセルロースを使用した。しかしながら、プラスチック、あるいはセファロースも使用可能である(ポルスキー(Polsky)-シンキン(Cynkin)他、1985, Clinical Chemistry, 印刷中)。

使用可能な他の方法は、DNAプローブを固定し、このプローブと、試料由来の放出され、精製されたrRNAとのハイブリッド形成である。フィルター上の得られたrRNA/DNAハイブリッドの存在は、上述の蛍光化したRNA/DNA特異

(35)

細菌種	細胞数	吸光度
C.ジェジュニ(C. jejuni)	$1 \times 10^8$	1.75
	$1 \times 10^7$	0.38
大腸菌 (E. coli)	$5 \times 10^8$	0.026

上記結果から、プローブAR196およびAR197は、明らかに大腸菌(E. coli)細胞抽出液とはハイブリッドを形成せば、C.ジェジュニ(C. jejuni)の細胞抽出液とはハイブリッドを形成することが示される。

#### 他の態様

他の態様は特許請求の範囲に含まれている。必要とするプローブの数は、一部には、各場合に必要とされる感度および誤まつた陰性結果に対する許容度によって依存する。一般的に、1個以上のプローブを使用する。

カンピロバクター(Campylobacter)の他の種を、DNA源として最初のクローニング実験において使用し得る;同様に、他の非カンピロバクター種も続くプローブ検定に使用し得る。

(37)

的抗体を用いて検出可能である。

定量アッセイでは、第2図に示したDNAプローブAR196およびAR197は、ビオチンで非放射能標識し(モック(Mock)他、米国特許出願第766,038号;1985年8月19日出願、本出願人に譲渡)、C.ジェジュニ(C. jejuni)および大腸菌(E. coli)の細胞溶解液に対してプローブとして使用した。全ての得られたDNA/RNAハイブリッドは、DNA/RNAハイブリッドに対する抗体を固定化したプラスチックチューブに結合した。(抗DNA/RNA抗体はキタガワ(Kitagawa)他(1982, Mol. Immunol. 9:413)の示したように調製し、パーソンズ(Parsons)(1973, Methods in Enzymol., 73:224)の方法によりプラスチックチューブの表面に固定した。チューブに結合したビオチン量は、次に、チューブをアビジン処理した後に得られる吸光度から推定した。結果は下表のようになる。

(36)

#### 4. [図面の簡単な説明]

第1図は、C.ジェジュニ(C. jejuni)由来16S rRNAのヌクレオチド配列の2領域を示す塩基配列図である。

第2図は、オリゴヌクレオチドAR196, AR197, AR327, AR328, およびAR329のDNA配列図である。

代理人 弁理士 湯 浅 泰 三  
(外5名)

(38)

特開昭62-228096(11)

図面の浄書(内容に変更なし)

## 第1図その1

10	20	30	40	50	60
AAGCUUGCUA	GCUUGCUAGA	AGUGGAUUAG	UGGCGCACGG	GUGAGUAAAG	UAUAGUUAAU
70	80	90	100	110	120
CUGCCCUACA	CAAGAGGACA	ACAGUUGGAA	ACGACUGCUA	AUACUCUAAU	CUCCUGCUUA
130	140	150	160	170	180
ACACAAGUUG	ACUAGGGAAA	GUUUUUCGGU	GUAGGAUGAG	ACUAAUUAU	AUCAGCUAGU
190	200	210	220	230	240
UGGUAAGGUA	AUGGCUUACC	AAGGCUAUGA	CGCUUAAACUG	GUCUGAGAGG	AUGAUCAGUC
250	260	270	280	290	300
ACACUGGAAC	UGAGACACGG	UCCAGACUCU	ACGGGAGGCA	GCAUAGGGGA	AUAUUGCCCA
310	320	330	340	350	360
AUGGGGAAA	CCUGACGCA	GCAACGCCGC	GUGGAGGAUG	ACACUUUUCG	GAGCGUAAAC
370	380	390	400	410	420
UCCUUUUCU	AGGGAAGAAU	UCUGACGGUA	CCUAAAGAAU	AAGCACCAGC	UAAUCUCCUG
430	440	450	460	470	480
CCAGCAGCCG	CGGUAAUACG	GAGGGUGCAA	GCGUUAUCUG	GAAUCACUGG	GCGUAAAGGG
490	500	510	520	530	540
CGCGUAGGCG	GAUUAUCAG	UCUCAAGUGA	AAUCUAAUGG	CUUAGCCAUU	AAACUUCUUG
550	560	570	580	590	600
GGAACUCU	AGUUCUAGAU	GCAAGGAGAG	GCAAGUGGAU	UGGUGGUGUA	GGGUAAAUCC
610	620	630	640	650	
UAGAUAUCAC	AGAUAUUAUG	CGAGGCGAUC	UCUGGAUCCA	UCGAGCCUA...	

(約300塩基は配列が決定されていない)...

## 第1図その2

ACCAAGAAUA	CCCAUUGCGA	AGGCGAUCUG	CUGGAACUCA	ACUGACGCUA	AGGCGCGAAA
GCGUCCCCAG	CAAACAGGAU	UAAGAUACCC	UUGUAGUCCA	CGCCCUAAAA	CGACGUACAC
UAGUUUUUCC	CCUGCUAGUC	AUCUCUGUAU	UGUCGCUAAC	GCAUUAAAGUG	UACCGCCUAG
GGUGUACGGU	CGCAAGAUUA	AUUUCCGCAA	CGAGCGCACC	CACGUUUUUG	UUGCUAACGG
UUCGGACCGA	GACACUCUAA	AUAGGCUGCC	UUCGUAAAGGA	GGAGGAAGGU	GUGGACGACG
UCAAGUCAUC	AUGGCCCUUA	UGCCCAAGGC	GACACACGUG	CUACA AUGGC	AUAUAACAUG
AGACGCAUA	CCGCGAGGUU	GGGCAUUCUA	UAAAUUUGUC	CGGUUCGGAU	UGUUCUCUGC
AACUCGAGAG	CAUGAAGCCG	GAAUCGCUAG	UAAUCGUGGA	UCAGCCAUGC	UACGGUGAAU
ACGUUCCCGG	GUCUUGGAAC	UCACCGCCCG	UCACACCAUG	GGAGUUGAAU	UCACUCGAAG
CCGGAAUACU	AAACUAGUUA	CCGUCCACA	UGGAAUACCC	GGCGUGGGGG	UGAAGUCGUA
ACAAAGGUAA	CGUAGGAGAA	CCUGCGGUCG	GAUCACCUCC	U	

特開昭62-228096(12)

## 第2図

AR196

10	20	30	40	50
TATTAGCAGT	CGTTTCCAAC	TGTTGTCCTC	TTGTGTAGGG	CAGATTAAC

AR197

10	20	30	40	50
TACACCGAAA	AACTTTCCT	ACTCAACTTG	TGTTAAGCAG	GAGTATAGAG

AR127

10	20	30	40	50	60
ACCAATCCAT	CTGCTCTCC	CTGCACCTA	GACTATCAGT	TTCCCAAGCA	GTTTAATGGC

AR128

10	20	30	40	50
CGCCGGTGAT	TCCACTGTGG	ACGGTAACTA	GTTTAGTATT	CCGGCTTCGA

AR129

10	20	30	40	50	60
TAATGCGTTA	GCGACAATAC	AGAGATGACT	AGCAGGGGAA	TAAGTAGTGT	ACGTCTG

## 手続補正書(方式)

昭和62年4月7日

特許庁長官 黒田 明雄 殿

## 1. 事件の表示

昭和62年特許願第 13285 号

## 2. 発明の名称

カンピロバクター検出用プローブ

## 3. 補正をする者

事件との関係 出願人

住所

名称 インテグレートド・ジェネティクス・  
インコーポレーテッド

## 4. 代理人

住所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビル 206号室

氏名 (2770) 井理士 湯浅 恭三

## 5. 補正命令の日付 昭和62年3月31日(発送日)

## 6. 補正の対象

適正な図面

## 7. 補正の内容

別紙の通り(全図を通じて連続番号を記入したもの。  
尚、内容に誤りあり)